

Efecto de la recolonización vaginal por *Lactobacillus* sp. probiótico potencial en mujeres con vaginosis bacteriana

Effect of vaginal re-colonization by potential probiotic Lactobacillus sp. in women with bacterial vaginosis

HURTADO ESCAMILO, Steve Tony^{1,2,4}; BENITES CASTILLO, Santiago^{4,5}; RIVERA ESPINOLA, Carlos Napoleón^{1,3,5}; HURTADO ESCAMILO, Fanny Edith⁶.

No fueron encontrados conflictos de interés en este artículo.

RESUMEN

Una cepa de *Lactobacillus*, identificada como *Lactobacillus* sp. BMP9, fue seleccionada de 320 cultivos aislados de hisopados vaginales de entre 8 mujeres saludables con cero puntos según criterio de Nugent. *Lactobacillus* sp. BMP9 fue elegida en base a su producción de peróxido de hidrógeno principalmente (25mg/L), incubado a 37°C durante 48 horas en caldo Man Rogosa Sharpe determinada por el método enzimático Test Peróxidos-Merckoquant®. Se mostró la actividad antagónica de *Lactobacillus* sp. BMP9 contra *Staphylococcus aureus* mediante el método del botón de Lewus y en el sobrenadante del cultivo lactobacilar por el halo de inhibición de crecimiento y la no variación de la densidad óptica de la cepa indicadora, respectivamente. El efecto de la recolonización vaginal por *Lactobacillus* sp. BMP9, al momento de dormir por 7 noches, en las mujeres diagnosticadas con vaginosis bacteriana (VB) según test de Nugent mostraron cura del 81,75% (13/16) de VB y en las mujeres Normales (Nugent: 3 puntos) no se observó efectos negativos en el 100% (4/4) al día 30 de control post-tratamiento ($p < 0,05$) y OR 1,44. La cepa *Lactobacillus* sp. BMP9 podría ser un buen probiótico alternativo para los tratamientos y profilaxis de la VB y otras infecciones genitales a investigar.

Palabras clave: Vaginosis Bacteriana, probiótico vaginal, *Lactobacillus* probiótico.

ABSTRACT

One strain of *Lactobacillus*, identified as *Lactobacillus* sp. BMP9, was selected from among 320 strains isolated from vaginal swabs of between 8 healthy women with Nugent's score 0. *Lactobacillus* sp. BMP9 was chosen on the basis of its peroxide of hydrogen production mainly (25 mg/L), incubated at 37°C for 48 hours in Man Rogosa Sharpe broth, determined by Peroxidos-Merckoquant® enzymatic test. It was showed the antagonistic activity of *Lactobacillus* sp. BMP9 strain against *Staphylococcus aureus* through the spot-on-lawn method of Lewus and in the supernatant of lactobacillary culture by the growing inhibition zone and the optic density no change of strain indicator, respectively. The effect of vaginal re-colonization by *Lactobacillus* sp. BMP9, at bedtime for 7 nights, in women diagnosed with bacterial vaginosis (BV) by Nugent test showed cure of 81,75% (13/16) of BV and in the normal women (Nugent: 3 points) it wasn't observe negative effects of 100% (4/4) follow-up at day 30 post-treatment control ($p < 0,05$) and Odds ratio 1,44. *Lactobacillus* sp. BMP9 strain could be a good alternative probiotic to the treatments and prophylaxis of BV and others genital infections to research.

Palabras clave: Bacterial vaginosis, vaginal probiotic, probiotic *Lactobacillus*.

¹MSc. Microbiólogo Clínico. Hospital II-Chocope-Red Asistencial-EsSalud La Libertad. sthurtadoe@hotmail.com

²Laboratorio de Ayuda al Diagnóstico y Tratamiento.

³Servicio de Ginecología y Obstetricia.

⁴Dr. en Ciencias Biomédicas. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas - Universidad Nacional de Trujillo. sbenites_ucv@yahoo.es

⁵Médico. Universidad César Vallejo.

⁶Ministerio de Salud-Cajamarca-Cajabamba. revistaucv-ciencia@ucv.edu.pe

INTRODUCCIÓN

La microbiota vaginal humana puede cambiar en composición rápidamente, entre más de 50 especies, por razones no totalmente claras¹ y se forma mayormente por el ascenso de microbios, a lo largo del periné, del recto a la vagina.² Las cantidades y tipos de microbios fluctúan con los niveles hormonales, contacto sexual, duchas vaginales y dieta; sin embargo, la composición básica es relativamente simple, con lactobacilos (LB) dominantes en mujeres saludables.³

Las infecciones del tracto urogenital de origen bacteriano tienen una alta incidencia entre la población femenina mundial en edad reproductiva. Una gran proporción de estas enfermedades, como la vaginosis bacteriana (VB) son causados a menudo por múltiples agentes patógenos, tales como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* y *Bacteroides* spp., *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Prevotella*, *Mycoplasma hominis* etc.⁴

El género *Lactobacillus* consiste en bacilos grampositivos, no esporulados, catalasa y oxidasa negativo, no reducen nitrato, no producen indol ni H₂S, no licua la gelatina. La mayoría son homofermentativas, es decir forman ácido láctico a partir de glucosa como producto final de fermentación, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y en los humanos habitan como componente importante de la flora autóctona: en la vagina, tracto gastrointestinal y orofaringe. El término "Bacilo de Döderlein" incluye a cepas vaginales humanas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermenti*, *L. celobiosus* y *Leuconostoc mesenteroides*.⁵

En mujeres sanas, la microflora vaginal está dominada por especies de LB, con un nivel de 10⁷ - 10⁸ UFC/g de líquido, que ejercen una influencia significativa sobre la microbiología del ecosistema; los LB autóctonos previenen el sobrecrecimiento e invasión de bacterias patógenas⁶ por una combinación de mecanismos como: exclusión, competencia por nutrientes y liberación de sustancias antimicrobianas, tales como el peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, bacteriocinas, y biosurfactantes.²

Los probióticos son "microorganismos vivos que cuando son administrados en las cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable sobre la salud del huésped, o su fisiología".⁷ Actualmente hay un creciente interés en la utilización de los LB como probióticos

vaginales humanos.^{8,9} Estas bioterapias serían una alternativa eficaz al tratamiento convencional con antibacterianos contra patógenos que ya han desarrollado resistencia,^{9,10} teniendo además la ventaja de poder administrarlo durante el embarazo sin ningún riesgo,⁸ pues se ha observado al menos en ratones hembras, que no produjo efectos adversos, ni modificaciones estructurales o ultra estructurales en la vagina.¹¹

El ácido láctico producido por los *Lactobacillus* spp. ha sido ampliamente considerado como el factor que permite dominar el ecosistema vaginal; sin embargo, datos recientes sugieren que puede ser la producción de H₂O₂.¹² Mujeres colonizadas con LB productores de H₂O₂ son más propensas a mantener una flora vaginal normal que las mujeres con LB no productores de H₂O₂.¹³ Las especies de *Lactobacillus* facultativas producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno, mientras que las anaerobias no producen.⁵

La producción de H₂O₂ está fuertemente ligada con las especies y es un predictor para la colonización sostenida a largo plazo de la vagina. En mujeres monitoreadas durante 8 meses, el 96% (96/101) de quienes mantuvieron colonización por *Lactobacillus* spp. fueron colonizadas por cepas productoras de H₂O₂ de *Lactobacillus crispatus* o *L. jensenii*. En contraste, el 5% (1/21) de mujeres permaneció colonizada por cepas de LB no productoras de H₂O₂.¹⁴

Lactobacillus paracasei LCR 1289 es una cepa seleccionada de vagina humana por su potencial probiótico capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* in vitro debido al H₂O₂ producido¹⁵, por su adherencia a las células epiteliales vaginales y la competencia para receptores específicos de la exclusión.⁹

Con la visión de desarrollar una formulación de probióticos para el tratamiento y la prevención no sólo de la VB sino también otras infecciones del tracto urogenital, la presente investigación pretendió obtener una cepa vaginal de *Lactobacillus* sp. productor de H₂O₂ para el tratamiento de la vaginosis bacteriana, para luego analizarle algunas otras características probióticas y tecnológicas.

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de un cultivo probiótico potencial obtenido de *Lactobacillus* sp. en la recolonización vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se organizó en dos fases: 1) La obtención de una cepa de *Lactobacillus* sp. probiótico potencial (LBP) principalmente en función de sus mayores niveles de producción de H₂O₂ y 2) Evaluación del efecto de la recolonización

vaginal con dicha cepa de LBP en pacientes con Vaginosis Bacteriana (VB), atendidas por consulta externa en Ginecología del Hospital II Chocope - EsSalud, La Libertad, entre Noviembre del 2009 y Diciembre del 2010.

MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa de LBP denominada BMP9.

Las mujeres categorizadas según criterio de Nugent¹⁶ que cumplieron criterios de inclusión y exclusión: Para obtener la cepa de LBP, 8 de 18 a 38 años de edad con cero puntos, y para evaluar el efecto de la recolonización vaginal por BMP9, 16 de 23 a 40 años de edad con VB (7 a 10 puntos) y 4 de 23 a 39 años con 3 puntos.

METODO**1. Obtención del LBP vaginal****Aislamiento, Identificación y Selección.**

La cepa de LBP BMP9 vaginal se obtuvo de entre 8 mujeres saludables (Nugent: 0 puntos). Las muestras se enriquecieron en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 24 horas y luego se subcultivaron en Agar MRS e incubaron a 35 - 37°C, 5 - 7% de CO₂ por 24 - 48 h. Se aislaron y pre-seleccionaron 10 a 20 cultivos puros por cada una de las 4 muestras por donante, que no mostraron crecimiento de hongos, enterobacterias ni cocos grampositivos e identificaron por sus características morfológicas, tintoriales y pruebas bioquímicas confrontándolo con las de *L. acidophilus* ATCC 4356.

Las cepas con producción >20 mg/L de H₂O₂ en caldo MRS a 37°C / 24 - 48 h. según Test Peróxidos - Merckoquant-Merck®, crecimiento óptimo en 24 - 48 h. y supervivencia en agar MRS por ≥ 7 días, fueron pre-seleccionadas. Finalmente se eligieron aquellas que además mostraron la mayor adhesión a células epiteliales en la muestra original, producción estable de H₂O₂ tras subcultivos en caldo MRS a 35 - 37°C cada 72 horas y lograron la mayor acidez final (pH: 4,5).

Actividad antagonista de LBP BMP9 contra *Staphylococcus aureus*.

Se utilizó el método del botón¹⁷ y un cultivo salvaje indicador de *S. aureus* identificado por el sistema automatizado MicroScan-Siemens®. La prueba se realizó en agar MRS, anaeróticamente a 35 - 37°C. En placa de Petri de 100x15 mm con 10 mL de agar MRS, se colocó 2 µL de una suspensión con densidad óptica (DO) 1,70 de LBP BMP9 cultivada en agar MRS por 18 h y se incubó 8 h. Luego se adicionó 9 mL de Agar Müeller Hinton con 50 µL de la suspensión salina del cultivo indicador joven y DO de 0,06. La placa se incubó en 5 a 7% de CO₂ por 18 h. El efecto antibacteriano se detectó por presencia de halos de inhibición de crecimiento alrededor de las cepas de LBP BMP9 y por la presencia de catalasa. Además, en tubos conteniendo 3 mL de caldo MRS y de sobrenadante del cultivo de LBP BMP9 en caldo MRS incubado 24

- 48 h. a 35 - 37°C, 5 - 7% de CO₂, DO final 0,20, pH final de 4,5 y 25 mg/L de H₂O₂, obtenido tras la centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, se inocularon sendos cultivos de la cepa indicadora equivalentes a DO iniciales: 0,01 y 0,06. Los sistemas se incubaron a 35 - 37°C y durante cada hora durante 24 h. se midió la DO.

2. Evaluación de LBP BMP9 como probiótico vaginal

Grupo Tratamiento: Las 20 pacientes que recibieron vaginalmente, al acostarse durante 7 noches, en jeringa de tuberculina nueva, una suspensión de 10⁹ *Lactobacillus* sp. BMP9 productor de H₂O₂ viables⁹ en 1mL de SSF estéril. De las cuales 16 tuvieron VB y 4 fueron Normales según criterio de Nugent.

Obtención de biomasa de LBP BMP9: La biomasa del LB H₂O₂ Positivo seleccionado se realizó en agar MRS a partir de subcultivos en caldo MRS, incubado a 35 - 37°C. por 18 - 24 horas y 5 - 7% de CO₂. El cultivo puro de LBP BMP9 se suspendió en SSF estéril hasta la DO deseada.

Presentación del inóculo para tratamiento:

Las pacientes recibieron un tubo pyrex tapa rosca de 5 mL de capacidad, dentro de un sobre de papel aluminio, conteniendo 3 mL de una suspensión de LBP BMP9, con DO 1,70 en el MicroScan TurbidityMeter-Siemens® equivalente a 10⁹ UFC/mL determinado por recuento en placa de diluciones decimales seriadas.

Medición del efecto de recolonización vaginal por LB H₂O₂ Positivo BMP9:

Los controles se realizaron los días 1, 7, 15 y 30 post-tratamiento.¹⁸ Se realizaron sendas calificaciones de la secreción vaginal según criterio de Nugent¹⁹.

Las muestras se colectaron con ayuda de espéculos sin lubricación e hisopos estériles. Un primer hisopado se colocó dentro de tubo conteniendo 10 mL de caldo MRS. El segundo se extendió sobre una lámina portaobjeto para la tinción Gram⁵ y luego se introdujo en un tubo conteniendo SSF estéril para la calificación de la muestra.

Análisis estadístico: Los resultados sobre el efecto de la recolonización vaginal por *Lactobacillus* sp. BMP9 en mujeres con vaginosis bacteriana mostrados se analizaron, aplicándose la prueba de Ji-Cuadrado (X²) y Z con una significancia estadística del 95% y el Odds ratio para conocer el efecto protector de la cepa BMP9.

Aspectos éticos: Se siguieron las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos.¹⁹

RESULTADOS

En general las colonias de LBP seleccionadas presentaron forma circular, ligeramente convexa y borde entero en agar MRS, no hemolíticas. Los bacilos fueron Grampositivos, no esporulados, rectos y algunos ligeramente

curvados, catalasa negativa, ácido sulfúrico negativo.

LBP BMP9 se eligió para evaluar su potencial como probiótico vaginal, de entre 4 de 13 cultivos puros pre-seleccionados productores de

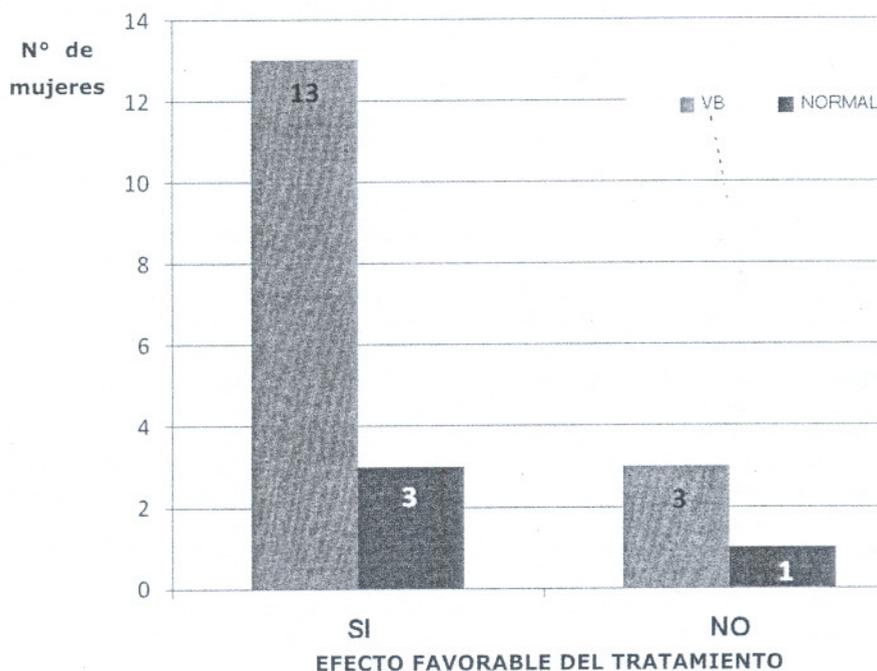
más de 25 mg/L de H₂O₂ en caldo MRS a 35 - 37°C, 5 - 7% de CO₂ por 24 - 48 horas según el método enzimático Test Peróxidos - Merckoquant-Merck®, a partir de 320 cultivos de LB aislados de la secreción vaginal de entre 8 mujeres con score cero puntos según criterio de Nugent.

LBP BMP9 demostró tener actividad antagonista contra la cepa salvaje de *Staphylococcus aureus*, evaluado mediante el método de Lewus y por la inhibición del crecimiento del sobrenadante de caldo MRS donde creció. El efecto se evidenció por la formación de halos de inhibición de crecimiento y la no variación de las DO iniciales, respectivamente; en cambio, en caldo MRS la cepa indicadora logró DO finales

equivalentes a 0,18 y 0,31 a partir de 0,01 y 0,06 respectivamente.

Mediante el criterio de Nugent, se evaluó el efecto de la recolonización vaginal en un grupo de 16 mujeres con VB (7 - 10 puntos) y en otro de 4 mujeres Normales (0 - 3 puntos), hasta los 30 días de control post-tratamiento (Anexo 1). En el grupo VB, el éxito llegó al 68.8% de normalización (Nugent final: 0 a 3 puntos) y al 81.25 % si lo consideramos como cura de VB (< 7 puntos) ($p < 0.05$) (Fig.1). No se observó efectos adversos y la recolonización con incremento de LB es 44% más probable en mujeres con VB que en Normales, cuando reciben vaginalmente un tratamiento con *Lactobacillus* sp. BMP9, al día 30 de control post-tratamiento (Odds ratio 1,44).

Figura 1. Efecto del tratamiento vaginal por *Lactobacillus* sp. BMP9. en mujeres con Vaginosis Bacteriana (VB) y Normales según criterio de Nugent al día 30 de control post-tratamiento. (Z_0 : -1,312; α = 0,05) (Odds ratio = 1,44).



DISCUSIÓN

Nuevas cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de vagina de mujeres saludables han demostrado que podrían ser candidatas prometedoras para uso en la preparación de productos probióticos.²⁰ Estudios previos han informado de que los lactobacilos adhesivos pueden inhibir in vitro la adhesión de patógenos tales como *E. coli*, *G. vaginalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. agalactiae* y *Candida albicans*.⁹

La identificación de la cepa *Lactobacillus* sp. BMP9 se hizo en base a características fenotípicas, aunque actualmente puede hacerse mediante técnicas de biología molecular.²¹

Considerando el antecedente de que la normalidad, según criterio de Nugent, en mujeres no gestantes y en edad fértil está mejor asociada a la presencia de LB vaginales productores de altos niveles de H₂O₂,¹⁵ en gestantes con un reducido riesgo de VB en las 20 semanas de gestación²² y reducción de vulvovaginitis recurrente,²³ el criterio principal para su selección como LBP fue la mayor producción de H₂O₂.

Otras características de los LBP a considerarse es la habilidad de coagregación con bacterias,²⁴ la habilidad de adhesión a células cervicovaginales,²⁵ tiempo óptimo de crecimiento, de supervivencia, acidez y estabilidad en la

producción de H_2O_2 ; este último criterio probablemente tiene relación con la colonización vaginal sostenida a largo plazo por este tipo de cepas encontradas en otras investigaciones.¹⁴ El patrón de resistencia antibiótica,²⁶ al nonoxinol-9²⁷ y otras características constituyen motivos de investigaciones futuras a considerar y evaluar en la cepa BMP9.

La cepa BMP9 mostró una buena actividad antibacteriana contra *S. aureus*. El efecto puede deberse no sólo a bacteriocinas, sino también al ácido láctico y otros metabolitos. En el sobrenadante del caldo MRS donde creció la cepa BMP9, el efecto principalmente fue debido a H_2O_2 producido (25mg/L ó 0.735 mmol/L). Estos niveles son mayores en comparación a los 15.5 mg/L encontrados por otros investigadores.²⁰ Los niveles de pH 4,5 probablemente no fue un factor inhibitorio para el crecimiento de *S. aureus*, pues es viable en ámbitos de pH amplios.⁵

El tratamiento de infecciones vaginales con muchas especies de *Lactobacillus* administradas en yogurt, en tabletas o en supositorios ha mostrado cierta eficacia clínica y en gestantes con VB en el primer trimestre de embarazo se observó una reducción del 81% del riesgo de infección genital.⁶ El efecto de la recolonización vaginal por *Lactobacillus* sp. BMP9 en mujeres con VB y Normales, según criterio de Nugent al día 30 de control post-tratamiento fue favorable con incremento de LB y no dependió del valor de Nugent al momento del diagnóstico, ni la edad ($X^2 = 2.9$, $p < 0.05$) (Anexo 1); sin embargo, existen factores no considerados en el estudio que podrían explicar los fracasos observados, como el factor hormonal³, presencia de fagos líticos y probablemente otros como el inmunológico.²⁸

Así mismo se refleja el factor protector de la BMP9 como probiótico vaginal al término de la evaluación (Figura 1). Sólo en 5 de 16 pacientes con VB no se logró la normalidad del micro-

ecosistema vaginal (Nugent: 0 - 3 puntos), aunque 2 de ellas si llegaron al estado intermedio (Nugent: 4 - 6 puntos). Con este producto se ha alcanzado un éxito del 68.8% de restablecimiento de la normalidad y de un 81.25% si lo consideramos como cura de VB, esto es Nugent < 7 puntos, aunque en este último criterio implica incluir además a las de que terminaron con flora Intermedia.

El fracaso en la curación de VB en una investigación similar fue del 10%, pero utilizaron simultáneamente dos cepas de LB;²⁹ en tanto, el presente estudio mostró un 18.75% (3/16). Probablemente se deba también a algunas bajas dosis aplicadas o la inadecuada conservación del producto, según las entrevistas post-tratamiento a las pacientes. Para que los LB ejerzan su función protectora contra los agentes de la VB podría ser necesario que se constituyan como biopelícula y para que esto ocurra es importante la concentración³⁰ y así asegurar la protección continua.

Es probable que la producción de H_2O_2 por los LB sea uno de los más importantes, pero no el elemento primario necesario para curar la VB; bajas concentraciones de LB productores de H_2O_2 fueron tóxicos para *G. vaginalis*, pero solo cuando se combinó con mieloperoxidasa y Cl^- que se encuentran en el *mucus* cervical.⁴

No se reportaron efectos adversos durante la bioterapia de recolonización vaginal con LB BMP9, al igual que en otras experiencias similares con diferentes cepas probióticas⁹ y el efecto favorable con incremento de LB fue 44% más probable en las mujeres con VB que en las normales (*Odds ratio* 1,44); sin embargo, aún cuando el efecto muy significativo ($Z_0: -1,312$; $\alpha = 0,05$) podría llegar al 100% de éxito, sería conveniente realizar más réplicas para obtener mayor fiabilidad de los resultados.

CONCLUSIONES

En las condiciones de trabajo expuestas, podemos concluir lo siguiente:

1. Se obtuvieron cultivos vaginales de *Lactobacillus* sp. productores de 25 mg/L de H_2O_2 para el tratamiento de la vaginosis bacteriana.
2. La cepa *Lactobacillus* sp. BMP9 mostró, in vitro,

actividad antagónica contra *Staphylococcus aureus*, inhibiendo su crecimiento.

3. La recolonización vaginal por *Lactobacillus* sp. BMP9 logró 81,25% de cura de VB y la normalización del 68,75% en mujeres con vaginosis bacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cribby S, Taylor M, Reid G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008;2008:256490. Epub 2009 Mar 29. PMID: 19343185 [PubMed - in process]
2. Reid G and Bruce A. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World Journal of Urology*. 2006;24(1):28-32.
3. Reid G. Probiotic *Lactobacilli* for urogenital health in women. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Sep;42 Suppl 3 Pt 2: S234-6. Review. PMID: 18685506
4. Falagas ME, Betsi GI and Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 657-664.

5. Washington Winn, Jr.; Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Ed. Lippincott Company. 6ta ed, 2005. p: 838-840. <http://books.google.com.pe/books>
6. Othman M, Neilson JP, Alfirevic Z. Probióticos para la prevención del trabajo de parto prematuro. *La Biblioteca Cochrane Plus*. 2008; número 3. Oxford, Update Software Ltd. (ISSN 1745-9990).
7. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in foods. 2002. Disponible en : <http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood-probio-en.stm>.
8. Paredes P, N. Bacilos de Döderlein y su rol en la prevención y tratamiento probiótico de la infección vaginal. *Rev. Diagnóstico*. 2006 Julio-Setiembre; 45(3): www.fihu-diagnostico.org.pe/revista/cont.html
9. Zárate G, Santos V, Nader-Macias ME. Efecto protector vaginal de *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 contra la infección urogenital Producido por *Staphylococcus aureus* en un modelo animal de ratón. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2007; 2007: 48358.
10. Andreu A, De la Rosa M, Cabero L. Justificación de una política de prevención de la enfermedad perinatal por estreptococos del grupo B (EGB). Recomendaciones. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999; 17:138-140.
11. Silva C, Rey R, Nader-Macías ME. Structural and ultrastructural studies of the urinary tract of mice inoculated with *Lactobacillus fermentum*. *British Journal of Urology* 2003; 91:878-882.
12. Hurtado-Escamilo ST. Efecto in vitro de tres características antibacterianas de *Lactobacillus* sp. vaginales de pacientes categorizadas según criterio de Nugent contra *Gardnerella vaginalis*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias - Microbiología Clínica. Post Grado - Universidad Nacional de Trujillo. 2001
13. Rabe LK and Hillier SL. Optimization of Media for Detection of Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus* Species. *J Clin Microbiol*. 2003 July;41(7):3260-3264. PMID: PMC165346
14. Vallor A, Antonio M, Hawes S and Hillier SL. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J. Infect. Dis*. 2001;184:1431-1436. [PubMed]
15. Juárez T, Bru E, Nader-Macias ME. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003;188(1):35-44.
16. Nugent R, Krohn M and Hiller SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29(2): 297-301.
17. Lewus C, Kaiser A, Montville T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocinas from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol*. 1991; 57: 1683-1688.
18. Marcone V, Calzolari E, Bertini M. Effectiveness of vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* following conventional metronidazole therapy: how to lower the rate of bacterial vaginosis recurrences. *New Microbiol*. 2008 Jul;31(3):429-33. PMID: 18843900 [PubMed - indexed for MEDLINE]
19. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos. Programa Regional de Bioética OPS/OMS. 2003. ISBN956-7938-03-2.
20. Aslim B, and Kilic E. Some Probiotic Properties of Vaginal Lactobacilli Isolated from Healthy Women. *Jpn J Infect Dis*. 2006;59:249-253.
21. Berger B, Pridmore R, Barretto C, Delmas-Julien F, Schreiber K, Arigoni F, and Brüßow H. Similarity and Differences in the *Lactobacillus acidophilus* Group Identified by Polyphasic Analysis and Comparative Genomics. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 2007;189(4):1311-1321.
22. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, Corfield A and M. Millar. Identification and H2O2 production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol*. 2004 February; 42(2):713-717. PMID: PMC344438
23. Metts J, Famula T, Trenev N and Clemens R. *Lactobacillus acidophilus*, Strain NAS (H2O2 Positive), in Reduction of Recurrent Candidal Vulvovaginitis. *The Journal of Applied Research*. 2003;Vol. 3, No. 4: 340-348.
24. Ekmekci H, Aslim B, Ozturk S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol*. 2009 Feb;53(2):59-65.PMID: 19291088 [PubMed - indexed for MEDLINE]
25. Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2008;2008:549640. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19190778.
26. Ocaña V, Silva C, Nader-Macias ME. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006:18182. PMID: 17485797.
27. Martín R, Soberón N, Vanechoutte M, Flórez AB, Vázquez F, Suárez JE. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol*. 2008 Dec;11(4):261-6. PMID: 19204898
28. Capra María Luján; Mercanti Diego Javier; Reinheimer Jorge Alberto; Quiberoni Andrea. Lisogenia en *Lactobacillus paracasei*: caracterización de dos fagos líticos liberados a partir de una cepa comercial. *Jornada; XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Argentina - Rosario 2008*. http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=106&congresos=yes&detalle_s=yes&congr_id=630997
29. Anukam K, Osazuwa E, Osemene G, Ehigiagbe F, Bruce A, Reid G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes and Infection*. 2006; 8: 2772-2776.
30. Farinati A, Miquelarena A y Vázquez G. Microbiota Vaginal y su conformación como Biopelícula. *Rev Argentina de Microbiología*. 2010; 42 (Supl 1): 89.

Anexo 1

Tabla 1. Valores de X^2 de las frecuencias observadas según edad, grupos bacterianos y valores de los test de Nugent al momento del diagnóstico (Dx) y días post-tratamiento vaginal con *Lactobacillus* sp. BMP9, en mujeres atendidas en el Hospital de Chochope II-EsSalud, 2010.

n°	Edad	NUGENT DIAGNOSTICO				NUGENT CONTROL				X^2
		BGP	CBGv-BGN	BcGN	N-0	N-1	N-2	N-3	N-4	
1	23	0	3	0	3	4	3	4	0	6.44
2	39	0	3	0	3	3	4	2	2	3.81
3	30	1	2	0	3	3	4	3	2	2.1
4	28	1	2	0	3	2	2	5	3	4.45
5	35	3	4	0	7	4	3	3	2	0.85
6	23	3	4	0	7	4	3	4	0	3.46
7	28	4	2	4	10	3	2	3	3	68.5
8	24	3	4	0	7	3	4	3	1	2.01
9	23	4	4	0	8	4	4	3	1	2.53
10	25	4	4	0	8	4	3	4	2	1.43
11	32	4	4	0	8	4	2	4	2	2.19
12	28	3	4	0	7	5	5	3	3	0.8
13	30	3	4	0	7	6	5	5	2	1.35
14	39	3	4	0	7	4	3	2	2	1.45
15	33	4	4	0	8	5	4	2	3	1.79
16	40	3	4	0	7	4	2	3	4	1.68
17	33	4	4	0	8	6	6	5	5	0.97
18	23	3	4	0	7	6	7	8	8	5.83
19	33	3	4	0	7	5	3	3	7	4.98
20	38	3	4	0	7	5	6	7	7	4.02

120.7

Leyenda: BGP: Bacilos grampositivos, CBGv: Cocobacilos gramvariables; BGN: Bacilos gramnegativos, BcGN: Bacilos curvos gramnegativos. N-0, score Nugent el día de diagnóstico; N-1, score Nugent el día 1 post- tratamiento; N-2, score Nugent el día 7 post- tratamiento; N-2, score Nugent el día 15 post- tratamiento; N-4, score Nugent el día 30 post- tratamiento;

Chi cuadrado (X^2) con g.l 19x7= 133; p:0.05 = 160.915